АННОТАЦИЯ

к диссертационной работе на соискание ученой степени доктора философии PhD
по специальности 6D070100 – «Биотехнология»
Кенешевой Сабины Товекелқызы
на тему **«Влияние семиорганических соединений йода на патогенные микроорганизмы с множественной лекарственной устойчивостью»**

Диссертационная работа представлена в форме серии статей, опубликованных в изданиях, входящих в первый и (или) второй квартиль по импакт-фактору по данным Journal Citation Reports (Clarivate Analytics), в соответствии с пунктом 5-1 Правил присуждения ученых степеней, утвержденным приказом Министра образования и науки Республики Казахстан от 31 марта 2011 года № 127 (с изменениями и дополнениями по состоянию на 06.01.2025), регламентирующих деятельность КОКСНВО МНВО РК.

Общая характеристика диссертационного исследования. Диссертационная работа посвящена исследованию оригинальных семиорганических соединений йода с аминокислотами и их влиянию на мультирезистентные микроорганизмы в экспериментах *in vitro*. В работе представлены данные по физико-химической характеристике полученных комплексов, оценке их антимикробной активности, модулирующему влиянию на антибиотикочувствительность, а также анализу изменений профилей дифференциальной экспрессии генов мультирезистентных штаммов под их воздействием.

Актуальность темы исследования. В настоящее время терапия инфекционных заболеваний осложняется ростом числа резистентных штаммов микроорганизмов, что представляет серьезную медицинскую и социально-экономическую проблему. Несмотря на разработку новых антибиотиков, их внедрение сопровождается быстрым формированием устойчивости, что обусловливает необходимость поиска альтернативных противоинфекционных средств неантибиотического ряда, а также адъювантов или потенциаторов антибиотиков, способных модулировать их эффективность. Создание йодсодержащих комплексов с различными органическими лигандами расширяет возможности их применения и модификации биологических свойств. Предполагается, что аминокислоты в составе комплексов могут играть важную роль как в структурной стабилизации комплекса, так и в его биологической активности. За счет аминокислотных лигандов такие комплексы могут быть способны влиять на внутриклеточные процессы, включая экспрессию генов и клеточный метаболизм. Это обосновывает актуальность их детального изучения в комплексе с вызванными ими изменениями в клетках микроорганизмов.

Цель исследования. Комплексное изучение влияния оригинальных семиорганических соединений йода с аминокислотами на бактерии с множественной лекарственной устойчивостью в экспериментах *in vitro*.

Задачи исследования:

1) получение и физико-химическая характеристика оригинальных семиорганических соединений йода с аминокислотами;

2) *in vitro* оценка антимикробной активности семиорганических соединений йода с аминокислотами в отношении модельных штаммов микроорганизмов;

3) исследование модулирующего эффекта семиорганических соединений йода с аминокислотами на антибиотикочувствительность модельных мультирезистентных штаммов микроорганизмов в экспериментах *in vitro*;

4) исследование влияния семиорганических соединений йода с аминокислотами на профили дифференциальной экспрессии генов у модельных мультирезистентных штаммов микроорганизмов, с использованием аннотированных референсных геномов, предварительно полученных методом полногеномного секвенирования.

Объекты исследования. В качестве моделей патогенных микроорганизмов использованы клинически значимые бактериальные штаммы из Американской коллекции типовых культур (ATCC), рекомендованные производителем для исследований антимикробной резистентности и разработки лекарственных средств.

Предмет исследования. Свойства и биологическое действие оригинальных семиорганических соединений йода с аминокислотами (аланином, глицином, изолейцином) на бактерии с множественной лекарственной устойчивостью.

Методы исследования.

Для реализации задачи 1: РСА (авторефрактометр CAD4 Enraf-Nonius); УФ-спектроскопия (спектрофотометр LAMBDA-35); ИК-спектроскопия (Фурье-спектрометр NICOLET 6700); термический анализ (синхронный термоанализатор STA 449 F1 Jupiter с термогравиметрией и дифференциальной сканирующей калориметрией); ЭДС (интегрированная с электронным микроскопом Quanta 3D 200i); титрование.

Для реализации задачи 2: метод двукратных серийных разведений согласно протоколам Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Для реализации задачи 3: диско-диффузионный метод Кирби-Бауэра с окончательной интерпретацией согласно протоколам CLSI; непарный двусторонний t-тест Стьюдента ($p < 0,05$) (GraphPad Prism 6.0.) для различий между контрольными и экспериментальными группами; метод регистрации кривых роста по оптической плотности в микропланшетном формате (Multiskan Ascent).

Для реализации задачи 4: выделение ДНК (PureLink Genomic DNA Kit); подготовка библиотек (SMRTbell); секвенирование ДНК (PacBio RS II, SMRT Cell 8Pac v3); контроль качества и обрезка ридов (UGENE v1.32.0); *de novo* сборка генома (SMRT Link v5.0.1); аннотация генома (RAST); идентификация ортологичных генов (OrthoFinder); выявление горизонтально перенесенных геномных островов (SeqWord Sniffer); выделение РНК (RiboPure Bacteria Kit); удаление рибосомной РНК (MICROBExpress Bacterial mRNA Purification Kit); оценка количества и качества РНК (NanoDrop 2000c, Bioanalyzer 2100 с RNA 6000 Nano LabChip Kit); подготовка библиотек (ферментативная фрагментация - Ion Total RNA Seq kit V2, баркодирование - Ion Xpress RNA-Seq Barcode 01–16 Kit); РНК-секвенирование (Ion Torrent PGM, Ion 318 Chip Kit V2); контроль качества ридов и обрезка адаптерных последовательностей (Trimmomatic, RNA QC в UGENE v.36); выравнивание ридов на референсный геном (Rsubread); подсчет числа ридов, перекрывающих участки генов (featureCounts); нормализация и статистический анализ дифференциальной экспрессии генов (DESeq2, GenomicFeatures); анализ метаболических путей (Pathway Tools v.26.0, KEGG); анализ обогащения по терминам онтологии генов (GO) и метаболическим путям (Smart table Pathway Tools); идентификация гомологичных генов (GET_HOMOLOGUES); оценка изменений экспрессии генов проводилась при условиях статистической значимости ($|\text{fold change}| \geq 2$ и $p \leq 0,05$); для оценки ко-регуляции генов рассчитывали коэффициенты корреляции Пирсона (Cp).

Основные положения, выносимые на защиту:

1) Семиорганические комплексы КС-25, КС-33, КС-51, КС-270, КС-271 представляют собой структурно организованные координационные системы, обладающие антимикробной активностью в отношении модельных микроорганизмов, включая MDR-штаммы [1-3].

2) Семиорганические комплексы КС-270, КС-271 с глицином модулируют антибиотикочувствительность у MDR-штаммов *Staphylococcus aureus* BAA-39 и *Escherichia coli* BAA-196. Наиболее выраженные эффекты наблюдаются при внесении комплексов в лаг-фазе роста и сопровождаются статистически значимым увеличением диаметров зон ингибирования роста, а также переходом категорий чувствительности для отдельных антибиотиков. Наблюдаемые эффекты указывают на фазозависимый характер [1].

3) Семиорганические комплексы КС-25, КС-33, КС-51 с аланином, глицином и изолейцином существенно влияют на дифференциальную экспрессию генов MDR-штаммов *Escherichia coli* ATCC BAA-196 и *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-39. Воздействие комплексов приводит к статистически значимым изменениям профилей дифференциальной экспрессии генов, включающих как общие консервативные паттерны ответа (*S. aureus* и *E. coli*), так и специфические особенности. Наиболее выраженные изменения затрагивают гены, связанные с окислительно-восстановительными процессами, центральным метаболизмом, белковым синтезом, дыханием, биосинтезом аминокислот, жирных кислот, клеточной стенки, стресс-ответом и углеводным обменом, включая гликолиз, глюконеогенез, ЦТК и альтернативные пути получения энергии. Характер транскриптомного ответа зависит от аминокислотного лиганда и фазы роста бактериальной культуры в момент воздействия [3].

Основные результаты исследования.

В рамках задачи 1 были получены и охарактеризованы оригинальные семиорганические соединения йода с аминокислотами: КС-25 (с аланином), КС-51 (с изолейцином), КС-33, КС-270 и КС-271 (с глицином). Показано, что КС-25 представляет собой димер аланина, стабилизированный трийодидом; КС-33 – тример глицина с участием Li^+ и I^-; КС-51 – комплекс изолейцина с участием

йодид-ионов и воды; КС-270 и КС-271 – трийодидные комплексы двух молекул глицина с хлоридом цезия. Физико-химические и спектральные данные подтверждают формирование координационных структур с участием функциональных групп аминокислот и присутствие разных форм йода (I_2, I^-, I_3^-) в растворах.

Результаты данных исследований представлены в публикациях [1-3].

В рамках задачи 2 была проведена *in vitro* оценка антимикробной активности полученных семиорганических комплексов КС-25, КС-33, КС-51, КС-270 и КС-271 в отношении модельных штаммов микроорганизмов, включая MDR-штаммы. Показано, что комплексы КС-25, КС-33 и КС-51 проявляют сопоставимую антимикробную активность в диапазоне 0,32–0,57 мг/мл в отношении MDR-штаммов *E. coli* ATCC BAA-196 и *S. aureus* ATCC BAA-39; для комплексов КС-270 и КС-271 данный показатель составляет 0,76–1,31 мг/мл. Испытания при кратковременной экспозиции с КС-25 показали выраженное бактерицидное действие комплекса в диапазоне 0,24–0,98 мкг/мл в отношении чувствительных и MDR-штаммов: *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC BAA-2523, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* TA2, *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* ATCC 33591 и *A. baumannii* ATCC BAA-1790.

Результаты данных исследований представлены в публикациях [1-3].

В рамках задачи 3 было проведено исследование по изучению модулирующего влияния семиорганических комплексов на антибиотикочувствительность MDR-штаммов в экспериментах *in vitro*. Показано, что комплексы КС-270, КС-271 с глицином модулируют антибиотикочувствительность у *S. aureus* ATCC BAA-39 и *E. coli* ATCC BAA-196. У *S. aureus* КС-270 в лаг-фазе модулировал чувствительность к амикацину, оксациллину и цефтриаксону; увеличивал зоны ингибирования для β-лактамов (ампициллин, амоксициллин, карбенициллин) и гентамицина; резистентность к цефепиму и тобрамицину снижалась до промежуточной. В ½ лог-фазе отмечена модуляция в отношении амоксициллина, карбенициллина и цефазолина. КС-271 проявлял сходные, но менее выраженные эффекты, включая изменение чувствительности к амикацину и модуляцию в отношении цефалоспоринов и аминогликозидов. У *E. coli* КС-270 в лаг-фазе модулировал чувствительность к ампициллину, гентамицину и тобрамицину; увеличивал зоны ингибирования для амоксициллина, карбенициллина, хлорамфеникола и эритромицина; в ½ лог-фазе сохранялась модуляция для карбенициллина, хлорамфеникола и тобрамицина. КС-271 оказывал менее выраженное влияние, ограниченное увеличением зон ингибирования для амоксициллина, тобрамицина (в лаг-фазе) и хлорамфеникола в ½ лог-фазе). Выяснено, что комплексы способны модулировать антибиотикочувствительность у MDR *S. aureus* и *E. coli*, однако КС-270 в лаг-фазе наиболее эффективен.

Результаты данных исследований представлены в публикации [1].

В рамках задачи 4 были проведены исследования по оценке влияния семиорганических комплексов КС-25, КС-33, КС-51с аланином, глицином и изолейцином на профили дифференциальной экспрессии генов у MDR-штаммов *S. aureus* ATCC BAA-39 и *E. coli* ATCC BAA-196. Для обеспечения корректного транскриптомного анализа предварительно было выполнено полногеномное секвенирование указанных штаммов с последующей *de novo* сборкой генома, аннотацией генов и депонированием полученных последовательностей в базу данных NCBI. Было определено, что геном *S. aureus* BAA-39 представлен одной хромосомой длиной 2 791 218 п.н. (GC – 32,9%) и имеет кассетный хромосомный элемент SCCmec с геном mecA, ассоциированным с метициллин-резистентностью. Геном *E. coli* BAA-196 имеет размер 4 682 561 п.н. (GC – 51%) и включает плазмиду длиной 266 396 п.н. (GC – 47%), содержащую гены устойчивости к различным классам антибиотиков и детерминанты вирулентности. Геномные последовательности депонированы в БД NCBI под ID номерами CP033505 для *S. aureus* ATCC BAA-39 и CP042865 (хромосома) и CP042866 (плазмида) для *E. coli* ATCC BAA-196, соответственно. Полученные последовательности использованы в качестве референсных при анализе дифференциальной экспрессии генов. Данный этап носит вспомогательный характер в рамках настоящего исследования, и его результаты представлены в дополнительных публикациях по диссертационной теме.

Анализ дифференциальной экспрессии генов показал, что комплексы КС-25 и КС-33 формируют сходные паттерны транскриптомного ответа у микробных клеток, тогда как для КС-51 характерен отличающийся профиль. Для *E. coli* при воздействии КС-25 и КС-33 характерно повышение экспрессии генов энергетического и углеводного обмена (включая ЦТК, глюконеогенез и альтернативные пути катаболизма), при воздействии КС-51 наблюдается противоположная

тенденция. У *S. aureus* транскриптомный ответ отличается от *E. coli* и характеризуется преимущественным подавлением транспортных процессов и перестройкой энергетического метаболизма; при этом КС-51 формирует наиболее отличающийся профиль изменения экспрессии генов. Воздействие КС-25, КС-33, КС-51 на оба MDR-штамма сопровождается статистически значимыми изменениями дифференциальной экспрессии генов, связанных с окислительно-восстановительными процессами, центральным метаболизмом (гликолитические и глюконеогенетические пути, ЦТК и альтернативные пути получения энергии), трансляцией, трансмембранным транспортом, функционированием дыхательных систем, биосинтезом аминокислот, жирных кислот, компонентов клеточной стенки и реакциями клеточного стресс-ответа. Результаты указывают на вклад органического лиганда в формирование характера транскриптомных изменений и особенностей биологического действия исследуемых комплексов. Анализ демонстрирует, что сходство или различие эффектов комплексов КС-25 и КС-33 (глицин и аланин) и КС-51 (изолейцин) напрямую зависит от аминокислоты в составе. Выраженность и направленность эффектов комплексов определяются аминокислотным лигандом в их составе, соотношением форм йода (I^-, I_2, I_3^-), присутствующих в структуре, и фазой роста бактерий.

Результаты данных исследований представлены в публикации [3].

Основные выводы исследования. На основе комплексного анализа экспериментальных данных установлена взаимосвязь между структурой семиорганических йодсодержащих комплексов и характером их биологического действия, что подтверждает роль аминокислотного лиганда как ключевого фактора, определяющего эффективность и направленность антимикробного и модулирующего эффектов. Было показано, что:

1) Комплексы КС-25, КС-33, КС-51, КС-270 и КС-271 представляют собой структурно организованные координационные системы, различающиеся по физико-химическим характеристикам;

2) Комплексы КС-25, КС-33, КС-51, КС-270 и КС-271 обладают антимикробной активностью в отношении модельных микроорганизмов, включая MDR-штаммы, что подтверждает их перспективность как потенциальных антимикробных агентов;

3) Комплексы с глицином КС-270, КС-271 оказывают фазозависимое модулирующее влияние на антибиотикочувствительность MDR-штаммов *E. coli* ATCC BAA-196 и *S. aureus* ATCC BAA-39, вызывая увеличение эффективности ряда клинически значимых антибиотиков – ампициллина, амоксициллина, карбенициллина, гентамицина и тобрамицина, что позволяет рассматривать данные соединения в качестве потенциальных адъювантов антибактериальной терапии;

4) Комплексы КС-25, КС-33, КС-51 с аланином, глицином, изолейцином, соответственно, изменяют профили дифференциальной экспрессии генов MDR-штаммов *E. coli* ATCC BAA-196 и *S. aureus* ATCC BAA-39, связанных с трансляцией, функционированием дыхательных систем, биосинтезом жирных и аминокислот, компонентов клеточной стенки, реакциями клеточного стресс-ответа и центральным метаболизмом, при этом при воздействии КС-25 и КС-33 наблюдаются сходные паттерны изменения экспрессии генов, отличающиеся от таковых для КС-51.

Научная новизна.

1) Впервые получен и охарактеризован ряд семиорганических соединений йода с аминокислотами (аланин, глицин, изолейцин): установлены их структура и физико-химические свойства;

2) Впервые проведена сравнительная оценка антимикробной активности полученных комплексов в отношении модельных штаммов микроорганизмов: установлено наличие антимикробного действия;

3) Впервые выявлено модулирующее влияние семиорганических йодсодержащих комплексов на антибиотикочувствительность MDR-штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-39 и *Escherichia coli* ATCC BAA-196: показано, что субингибирующие концентрации модулируют чувствительность к ряду антибиотиков, эффекты носят фазозависимый характер;

4) Впервые было проведено полногеномное секвенирование MDR-штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-39 и *Escherichia coli* ATCC BAA-196 с последующей *de novo* сборкой генома, аннотацией и депонированием полученных последовательностей в базу данных NCBI;

5) Впервые проведена оценка влияния данных комплексов на дифференциальную экспрессию генов MDR-штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-39 и *Escherichia coli* ATCC BAA-196: установлено, что изменения затрагивают гены, связанные с окислительно-восстановительными

процессами, трансляцией, метаболизмом, функционированием дыхательных систем и стресс-ответом, включая ключевые элементы центрального метаболизма; показаны различия транскриптомных ответов грамположительных и грамотрицательных бактерий, фазозависимость и зависимость эффекта от лиганда в составе комплекса.

Теоретическая значимость определяется вкладом в развитие представлений о роли органических лигандов в формировании биологического эффекта йодсодержащих соединений, что открывает новые перспективы для рационального дизайна соединений с прогнозируемыми свойствами. Полученные транскриптомные данные позволяют перейти от фенотипических наблюдений к молекулярному уровню интерпретации возможных механизмов действия, указывая на вероятное вовлечение ключевых генов и метаболических путей.

Практическая значимость. Семиорганические соединения йода с аминокислотами проявляют антимикробную активность в отношении мультирезистентных штаммов и могут рассматриваться как объекты для дальнейших прикладных исследований. Показано, что данные соединения способны влиять на профиль антибиотикочувствительности, что указывает на их потенциальную применимость в качестве вспомогательных компонентов для повышения эффективности антибактериальных препаратов. Полученные результаты могут быть использованы при планировании доклинических исследований, а также при разработке комбинированных подходов к терапии инфекций и стратегий рационального применения антимикробных средств.

Связь с приоритетным направлениям развития науки и государственными программами. Исследования были проведены в рамках научно-исследовательских программ BR24992760, BR218004/0223, O.0776 и BR09458960 МНВО РК, Министерства Здравоохранения РК и Министерства индустрии и инфраструктурного развития РК.

Публикации и личный вклад автора в исследование. Диссертационная работа представлена в форме серии научных статей в изданиях, входящих в Q1/Q2 согласно данным JCR (Clarivate Analytics): *Biomedicines* – Q1 (WoS, Scopus); *BMC Research Notes* – Q2 (WoS, Scopus); *Microorganisms* – Q2 (WoS), Q1 (Scopus).

Дополнительно по теме исследования опубликованы научные работы и получены патенты, не вошедшие в доклад диссертационного исследования: 1 статья в *Engineered Science* (Q1, Scopus), 2 – в *Microbiology Resource Announcements* (Q3, Scopus), 2 – в изданиях КОКСНВО МНВО РК, а также 2 патента на полезную модель.

[1] **Kenesheva, S. T.**, Turganbay, S., Jumagaziyeva, A. B., Askhatkyzy, G., Askarova, D. A., Azembayev, A. A., Ilin, A. I., Reva, O. N., & Karpenyuk, T. A. (2025). The Effect of Semiorganic Iodine-Containing Compounds on the Antibiotic Susceptibility of Pathogenic Microorganisms. *Biomedicines*, 13(8), 1790. https://doi.org/10.3390/biomedicines13081790.

Q1 (JCR, Web of Science), Q1 (CiteScore, Scopus, 84-й процентиль)

Вклад автора включал разработку методологии исследования, валидацию полученных результатов, проведение формального анализа данных, выполнение экспериментальной части работы, обработку и систематизацию данных, подготовку первоначального варианта рукописи, а также визуализацию полученных результатов. В данной публикации докторант является первым и корреспондирующим автором.

[2] Turganbay, S., **Kenesheva, S. T.**, Jumagaziyeva, A. B., et al. (2024). Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial activity of a di-aminopropionic acid hydrogen tri-iodide coordination compound. *BMC Research Notes*, 17, 384. https://doi.org/10.1186/s13104-024-07052-8.

Q2 (JCR, Web of Science), Q2 (CiteScore, Scopus, 70-й процентиль)

Вклад автора включал анализ и интерпретацию полученных данных, а также подготовку текста рукописи. В данной публикации докторант является вторым и корреспондирующим автором.

[3] **Kenesheva, S. T.**, Taukobong, S., Shilov, S. V., Kuznetsova, T. V., Jumagaziyeva, A. B., Karpenyuk, T. A., Reva, O. N., & Ilin, A. I. (2023). The Effect of Three Complexes of Iodine with Amino Acids on Gene Expression of Model Antibiotic Resistant Microorganisms *Escherichia coli* ATCC BAA-196 and *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-39. *Microorganisms*, 11(7), 1705. https://doi.org/10.3390/microorganisms11071705.

Q2 (JCR, Web of Science), Q1 (CiteScore, Scopus, 78-й процентиль)

Вклад автора включал выполнение экспериментальной части работы, проведение обработки и систематизации данных, подготовку текста рукописи, а также рецензирование и редактирование рукописи. В данной публикации докторант является первым автором.